

PCT/EP 98 / 05899
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



09/508095 EPO - DG 1 E✓

25. 11. 1998

Bescheinigung

REC'D	10 DEC 1998
WIPO	PCT

Herr Professor Dr. Wolf-Georg F o r s s m a n n in
Hannover/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Be-
zeichnung

"Bifidogene Peptide"

am 11. Februar 1998 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung,
von denen die Beschreibung Seiten 1 bis 15 und 17 mit den
Patentansprüchen sowie 4 Blatt Zeichnungen am 11. Februar 1998
und die Seite 16 der Beschreibung am 27. Mai 1998 eingegangen
sind.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifika-
tion erhalten.

München, den 24. September 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag



Aktenzeichen: 198 05 385.1

Rixner

10. Februar 1998

Bifidogene Peptide

Die vorliegende Erfindung betrifft bifidogene Peptide, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie die Verwendung der bifidogenen Peptide.

Von Milch ist bekannt, daß sie fördernd auf den Gesundheitszustand von Säuglingen wirkt. Dies wird vielfach auf den Einfluß der Milch auf die Ausbildung einer säuglingstypischen Darmflora zurückgeführt, die zu mehr als 90% aus *Bifidobacterium bifidum* besteht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es Peptide bereitzustellen, die einen positiven Einfluß auf die Darmflora haben.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch Peptide mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Bei den erfindungsgemäßen Peptiden handelt es sich um Peptide, die erhältlich sind durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,

- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

$$\frac{BW}{B0} - \frac{EW}{E0} \geq 0,15 \text{ (bifidogen)}$$

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird,

B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird,

E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids
- sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

Die erfindungsgemäßen Peptide wirken antimikrobiell gegen Bakterien, die in der natürlichen Säuglingsdarmflora nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen und fördern das Wachstums von erwünschten Bakterien wie Bifidobakterien, indem sie die Bifidobakterien im Wachstum stärker als andere Bakterien fördern oder nur die nichterwünschten Bakterien selektiv hemmen. Diese Eigenschaft, Bifidobakterien einen Wachstumsvorteil zu verschaffen, wird als bifidogen bezeichnet.

Bevorzugt werden Peptide eingesetzt, die folgende Aminosäuresequenz aufweisen:

R_1 -EQLLRLKK- R_2 , R_1 -YLEQLLRLKKY- R_2 , R_1 -NRQRNILR- R_2 ,
 R_1 -YMNGMNRQRNILR- R_2 , R_1 -FQWQRNMRK- R_2 , R_1 -HTGLRRTA- R_2 ,
 R_1 -FTAIQNLRK- R_2 , R_1 -EVAARARVW- R_2 , R_1 -WQRNMRKV- R_2 ,
 R_1 -LARTLKRLK- R_2 , R_1 -YKQKVEKV- R_2 , R_1 -LVRYTKKV- R_2 ,
 R_1 -KYLIEIARR- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVG- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVGE- R_2 ,
 R_3 -C^IAL- R_4 R_3 -C^IAL- R_4

R_1 -YQRRPAIAINNPYVPRTYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMR^RVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKV^RRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKV^RRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -VYQHQQAMPKPW^IQPKTKVIPYVRYL- R_2 , R_1 -ARRARVVWAAVG- R_2 ,

worin

R_1 , R_3 unabhängig voneinander NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und
 R_2 , R_4 unabhängig voneinander $COOH$, $CONH_2$, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

Bevorzugt weisen R_1 , R_2 , R_3 , R_4 eine Länge von bis zu 50, mehr bevorzugt von bis zu 20 und am meisten bevorzugt eine Länge von bis zu 10 Aminosäuren auf.

Die erfindungsgemäßen Peptide können durch Aufreinigung aus Kuhmilch oder Humanmilch erhalten werden. Alternativ ist jedoch auch die Expression in gentechnisch veränderten Organismen oder die Herstellung durch chemische Peptidsynthese möglich.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind die Nukleinsäuren, die für die bifidogenen Bakterien kodieren, sowie Antikörper, die gegen bifidogene Peptide gerichtet sind.

Die erfindungsgemäßen Peptide und/oder Nucleinsäuren können zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen in Arzneimitteln enthalten sein. Dazu werden bevorzugt galenische Zubereitungen eingesetzt und Applikationsformen gewählt, bei denen die Peptide undegradiert an den Wirkort gelangen.

Vorzugsweise wurden die erfindungsgemäßen Peptide in Mengen von 0,1 bis 100 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Wirksame Nucleinsäuremengen sind beispielsweise 0,01 mg bis 100 mg/kg Körpergewicht. Bevorzugt liegt die Menge im Bereich von 1 bis 10 mg/kg Körpergewicht für die Peptide und Nucleinsäuren.

Die erfindungsgemäße Peptide können auch zusammen mit Nährstoffen in Nahrungsmittel enthalten sein.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Peptide und/oder die gegen die Peptide gerichteten Antikörpern zusammen mit weiteren Hilfsstoffen auch in Diagnostikmittel enthalten sein.

Die erfindungsgemäßen Peptide und Nukleinsäuren eignen sich zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingte Erkrankungen wie Infektionen, Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies. Die mikrobielle Fehlbesiedlung kann beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien und/oder Plasmodien bedingt sein.

Die erfindungsgemäßen Peptide eignen sich auch als Hilfsstoff in der Nahrungsmittelzubereitung im Sinne von Fermentationshilfen.

Es wird insbesondere bevorzugt, daß zwei oder mehr Peptide gemeinsam eingesetzt werden oder Peptide eingesetzt werden, die zwei oder mehr der erfindungsgemäßen Peptidsequenzen aufweisen. Das unterschiedliche Wirkungsspektrum der Einzelstoffe bzw. Stoffe, die Einzelsequenzen oder erfindungsgemäße Peptide aufweisen, erlaubt es, beim Vorliegen von Resistenzen von Mikroorganismen durch eine geeignete Kombination von Sequenzen oder durch eine Kombination der Einzelsubstanzen eine optimale Hemmung der unerwünschten Mikroorganismen zu erzielen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter erläutern:

Beispiel 1

Behandlung von Milch

Humane Milch wurde mit Pepsin (20 mg/g Protein) versetzt, nachdem sie mit HCl auf einen pH von 3,5 eingestellt wurde. Die enzymatische Reaktion wurde für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und durch Kochen für fünf Minuten gestoppt. Anschließend wurde zentrifugiert (20 min, 60.000 g bei 4°C) und das Milchfett abgeschöpft. Die verbliebene Lösung wurde mit 0,1 % TFA versetzt und erneut zentrifugiert, um ausgefallene hochmolekulare Proteine abzutrennen.

HPLC Reinigung eines bifidogenen Peptides aus Milch

Für die Reinigung von bifidogenen Peptiden aus Milch müssen verschiedene HPLC Trennverfahren miteinander kombiniert werden, um eine möglichst reine Darstellung über eine optimale Trennleistung zu erzielen und inaktive, unerwünschte Bestandteile abzutrennen. Die jeweiligen Proben, die nach jedem Trennungsschritt entstehen, müssen in zwei Testsystemen getestet werden, d.h. ein Wachstumstest mit Bifidobakterien in Kombination mit einem Wachstumstest mit E. coli als Target (siehe Beispiele 3 und 4). Notwendig für die Reinigung ist die Kombination von mindestens einem Reverse-Phase Chromatographieschritt (bevorzugt

von zwei Reverse-Phase Chromatographischritten) und der Einsatz einer Kationenaustausch-HPLC-Trennung. In den Biotest muß die jeweilige Probe salzarm eingesetzt werden, um ein möglichst optimales Screeningergebnis zu erhalten.

Der erste Trennschritt wurde mit Hilfe einer Parcosil-C18 Säule (1 x 12,5 cm, 100 Å, Biotek, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: Acetonitril mit 0,1% TFA

Gradient: 0 bis 60% B in 45 Minuten

Fluß: 2 ml / min

Detektion 280 nm (siehe Figur 1)

Rechromatografie von Fraktion 23 mit der gleichen Säule und einem flacheren Gradient (siehe Bild):

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B : Acetonitril mit 0,1% TFA

Gradient: 0 bis 20% B in 5 Minuten

20 bis 50% B in 45 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 2)

Rechromatografie von Fraktion 16 aus dem vorangegangenen Trennschritt mit der gleichen Säule, aber anderem Elutionsmittel, um die Selektivität bei der Trennung zu verändern.

Puffer A: 0,1% TFA

Puffer B: 0,1% TFA in Methanol

Gradient: 0 bis 40% B in 5 Minuten

40 bis 70% B in 45 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 3)

Rechromatografie der aktiven Fraktion 21 mit einer Kationenaustausch HPLC:

Säule: Parcosil Pepkat, 4 x 50 mm, 300 Å, 5 µm, Biotek, Heidelberg

Puffer A: 10 mM Phosphatpuffer pH 4,5

Puffer B: Puffer A mit 1 M NaCl

Fluß: 0,75 ml/min

Gradient: 0 bis 15% B in 5 Minuten

15 bis 50% B in 35 Minuten

Detektion: 214 nm (siehe Figur 4)

Die erhaltenen Fraktionen wurden jede einzeln in einem kurzen Reverse Phase HPLC Lauf entsalzt; bevor sie zum Test auf antimikrobielle und bifidogene Aktivität zugeführt wurde.

Durch Massenspektrometrie und Aminosäuresequenzierung wurden die folgenden Peptide identifiziert:

Fraktion 9 enthielt die reine, bifidogene Komponente

YQRRPAIAINNPYVPRYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRRPNLHPSF

(caseinK-63-117)

Fraktion 10 enthält die bifidogene Komponente

GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPICCIQA

(neutrophil-lactoferrin-20-67)

und Fraktion 11 enthält die bifidogene Komponente mit einer Adduktmasse von +16 was darauf hindeutet, daß es sich um ein Oxidationsprodukt handelt (vermutlich ist ein Methionin oxidiert).

Beide Peptide und das Oxidationsprodukt haben eine bifidogene Aktivität.

Beispiel 2

Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf E. coli

Fraktionen aus der HPLC wurden mit *E. coli* K12 eingesetzt. Der Test wird in 3 g/l Tryptic Soy broth (Sigma) folgendermaßen durchgeführt:

Für jeden Assay wurden Kulturen von *E. coli* K12 frisch in Tryptic Soy broth (Sigma) angeimpft. Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter aeroben Bedingungen bei 37°C für 16 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer Testlösung, bestehend aus 200 µl 3 g/l Tryptic Soy broth, in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 µl einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug 0,05, gemessen bei 500 nm. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISA-Reader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt.

Beispiel 3

Nachweis der wachstumsregulierenden Aktivität auf Bifidobacterium bifidum

Für jeden Assay wurden Kulturen von *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 frisch in Elliker broth (Difco, Detroit, USA) angeimpft. Die Inkubation dieser Bakterien erfolgte immer unter anaeroben Bedingung bei 37°C für 16 bis 18 Stunden. Zu testende Peptide wurden zu einer Testlösung bestehend aus 200 µl 50% Elliker broth in 96-Loch Zellkulturplatten gegeben und mit einem Inokulum von 20 µl einer verdünnten Bakteriensuspension angeimpft. Die photometrische Absorption des Inokulums betrug 0,05 gemessen bei 550 nm. Das Wachstum der Bakterien unter dem Einfluß der

Peptide wurde nach 16 Stunden ebenfalls photometrisch im ELISA-Reader bestimmt und manuell mikroskopisch bestimmt. Als Positivkontrolle diente N-acetylglucosamin. Für diesen Test können nur Bifidus-Kulturen eingesetzt werden, die auf N-Acetylglucosamin reagieren. Nach einigen Passagen verlieren Bifidobakterien diese Eigenschaft, diese können dann für diesen Wachstumstest nicht mehr eingesetzt werden.

Beispiel 4

Als bifidogen wurden die Fraktionen identifiziert, bei denen der Wert

BW	EW	
--	--	≥ 0,15 (bifidogen)
B0	E0	

ist.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Wolf-Georg Forssmann
- (B) STRASSE: Feodor-Lynen-Strasse 31
- (C) ORT: Hannover
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 30625

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Bifidogene Peptide

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 22

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys

1

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Tyr Leu Glu Gln Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr

1

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Asn Arg Gln Arg Asn Ile Leu Arg
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Tyr Met Asn Gly Met Asn Arg Gln Arg Asn Ile Leu Arg
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Glu Val Ala Ala Arg Ala Arg Val Val Trp
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Leu Ala Arg Thr Leu Lys Arg Leu Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Tyr Lys Gln Lys Val Glu Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Cys Ile Ala Leu
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala Val Gly Glu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 55 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Tyr Gln Arg Arg Pro Ala Ile Ala Ile Asn Asn Pro Tyr Val Pro Arg
1 5 10 15
Thr Tyr Tyr Ala Asn Pro Ala Val Val Arg Pro His Ala Gln Ile Pro
20 25 30
Gln Arg Gln Tyr Leu Pro Asn Ser His Pro Pro Thr Val Val Arg Arg
35 40 45
Pro Asn Leu His Pro Ser Phe
50 55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 49 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Thr Val Ser Gln Pro Glu
1 5 10 15
Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Arg Val Arg Gly
20 25 30
Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln
35 40 45
Ala

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Val Tyr Gln His Gln Lys Ala Met Pro Lys Pro Trp Ile Gln Pro Lys
1 5 10 15
Thr Lys Val Ile Pro Tyr Val Arg Tyr Leu
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: nicht bekannt

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Ala Ala Val Gly
1 5 10

Patentansprüche

1. Peptide erhältlich durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um MilCHFett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,
- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

BW		EW	
--	-	--	≥ 0,15 (bifidogen)
B0		E0	

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/ml erhalten wird, B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstoff-freien Kontrollinkubation erhalten wird.

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von 200 µg/l erhalten wird,

E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstoff-freien Kontrollinkubation erhalten wird,
- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids

sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phospho-rylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Frag-mente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.

2. Peptide gemäß Anspruch 1 mit der Aminosäuresequenz
 R_1 -EQLRLK- R_2 , R_1 -YLEQLRLKKY- R_2 , R_1 -NRQRNILR- R_2 ,
 R_1 -YMNGMNRQRNILR- R_2 , R_1 -FQWQRNMRK- R_2 , R_1 -HTGLRRTA- R_2 ,
 R_1 -FTAIQNLRK- R_2 , R_1 -EVAARARVW- R_2 , R_1 -WQRNMRKV- R_2 ,
 R_1 -LARTLKRLK- R_2 , R_1 -YKQKVEKV- R_2 , R_1 -LVRYTKKV- R_2 ,
 R_1 -KLYEIIARR- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVG- R_2 , R_1 -ARRARVVWCAVGE- R_2 ,
 R_3 -CIAL- R_4 R_3 -CIAL- R_4
- R_1 -YQRRPAIAINNPYVPRTYYANPAVVRPHAQIPQRQYLPNSHPPTVVRPNLHPSF- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCTVSQPEATKCFQWQRNMRVRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVGRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVGRGPPVSCIKRDSPIQCIQA- R_2 ,
 R_1 -VYQHQAAMPKPWIQPKTKVIPYVRYL- R_2 , R_1 -ARRARVVWAAVG- R_2 ,

worin

R_1 , R_3 unabhängig voneinander NH_2 , eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis 100 Aminosäuren darstellen und
 R_2 , R_4 unabhängig voneinander $COOH$, $CONH_2$, eine Aminosäure oder ein Peptid mit bis zu 100 Aminosäuren darstellen und die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylier-ten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften.

3. Verfahren zur Herstellung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 durch Aufreinigung aus Kuhmilch oder Humanmilch, Expression in gentechnisch veränderten Organismen oder chemische Synthese.
4. Nukleinsäuren kodierend für Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2.
5. Antikörper gerichtet gegen Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2.
6. Arzneimittel enthaltend mindestens eines der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder mindestens eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 zusammen mit pharmazeutisch üblichen Hilfsstoffen.
7. Nahrungsmittel enthaltend Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 zusammen mit Nährstoffen.
8. Diagnostikmittel enthaltend Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder Antikörper gemäß Anspruch 5 zusammen mit weiteren Hilfsstoffen.
9. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 und/oder der Nucleinsäuren gemäß Anspruch 3 zur Behandlung von durch mikrobielle Fehlbesiedlungen bedingten Erkrankungen beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Hefen, Protisten, Viren, Mycoplasmen, Filarien, Plasmodien, wie Infektionen Entzündungen, mikrobiell induzierten Tumoren, mikrobiell bedingten degenerativen Erkrankungen, Durchfallerkrankungen, Koliken, Abweichung der Mund-, Darm- und Vaginalflora, Karies.
10. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 und/oder 2 zur Herstellung eines Nahrungsmittels.

Zusammenfassung

Peptide erhältlich durch

- Versetzen von Kuhmilch oder Humanmilch mit Proteasen und anschließender Inkubation für zwei Stunden,
- Zentrifugation, um Milchfett zu entfernen,
- Ansäuern auf einen pH von 2,0 durch starke Säuren,
- Abtrennung der ausgefallenen Proteine,
- Anwendung mindestens eines Reverse-Phase-HPLC-Schrittes,
- Anwendung eines Kationenaustauscher-HPLC-Schrittes,
- Sammeln von Fraktionen,
- Einstellen der Fraktion auf einen Salzgehalt < 25 mM für die Durchführung von Aktivitätstests durch Dialyse oder Reverse-Phase-HPLC,
- Kultivierung von Bifidobakterium Bifidum und E. coli in Gegenwart der Fraktionen und Auswahl von Fraktionen, die der Bedingung

BW		EW	
--	-	--	$\geq 0,15$ (bifidogen)
B0		E0	

genügen, worin BW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von Bifidobakterium Bifidum in 50% Elliker Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ erhalten wird,

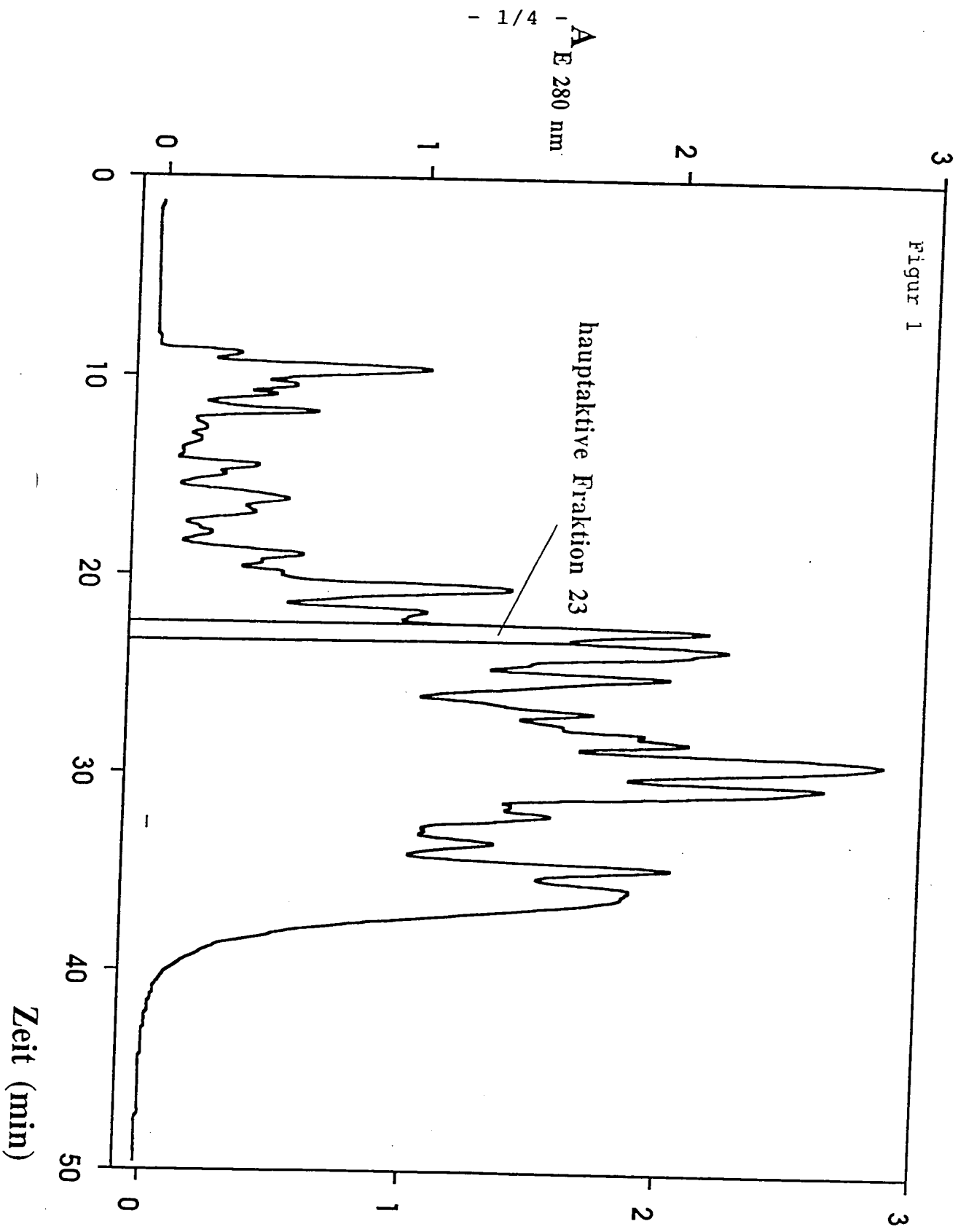
B0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird.

EW die Keimzahl bezeichnet, die bei 16-stündiger Inkubation von E. coli in 3 g/l Tryptic Soy Broth in Gegenwart der Peptide in einer Konzentration von $200 \mu\text{g/l}$ erhalten wird,

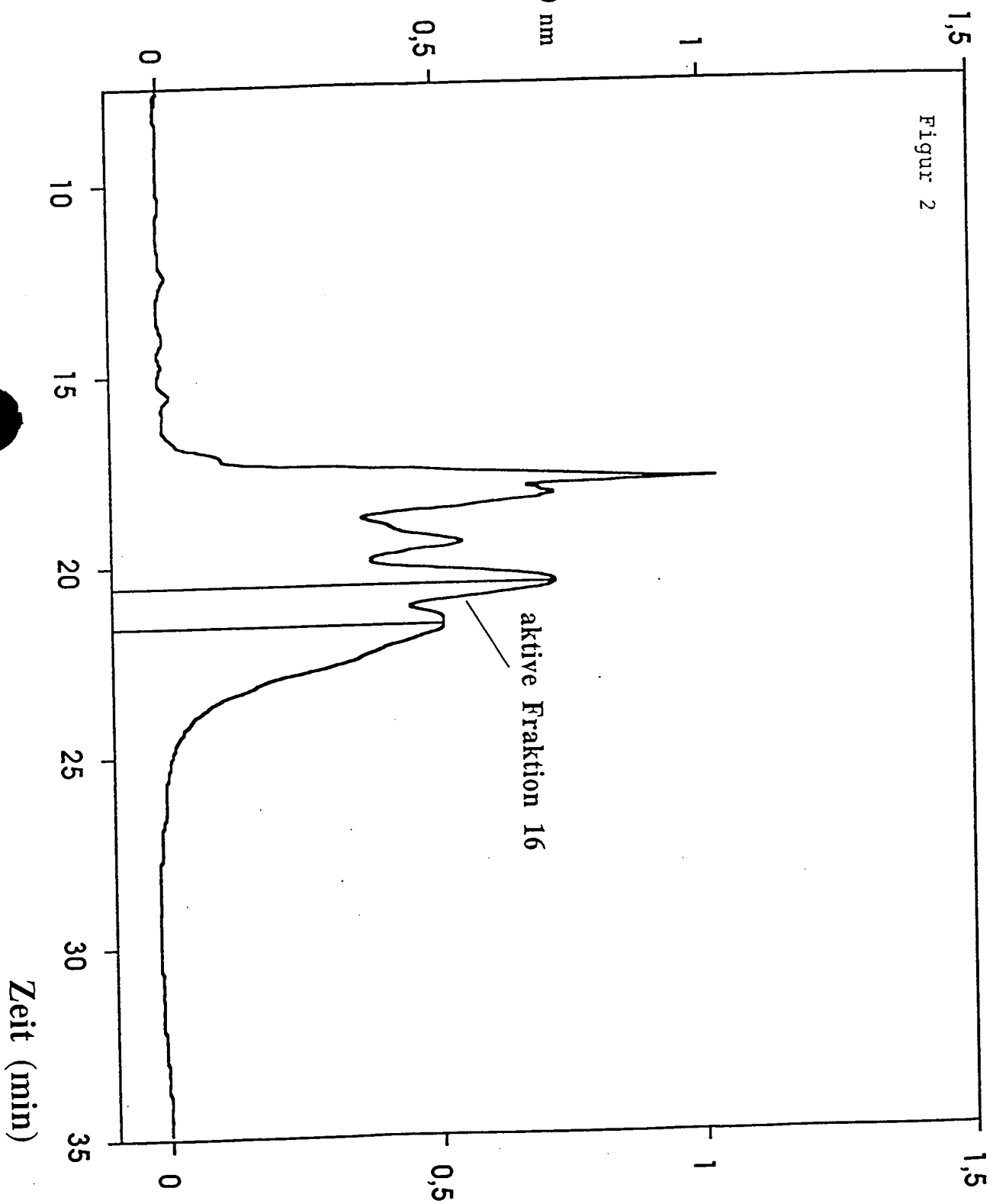
E0 die Keimzahl bezeichnet, die bei der wirkstofffreien Kontrollinkubation erhalten wird,

- Isolierung des in dieser Fraktion vorhandenen Peptids

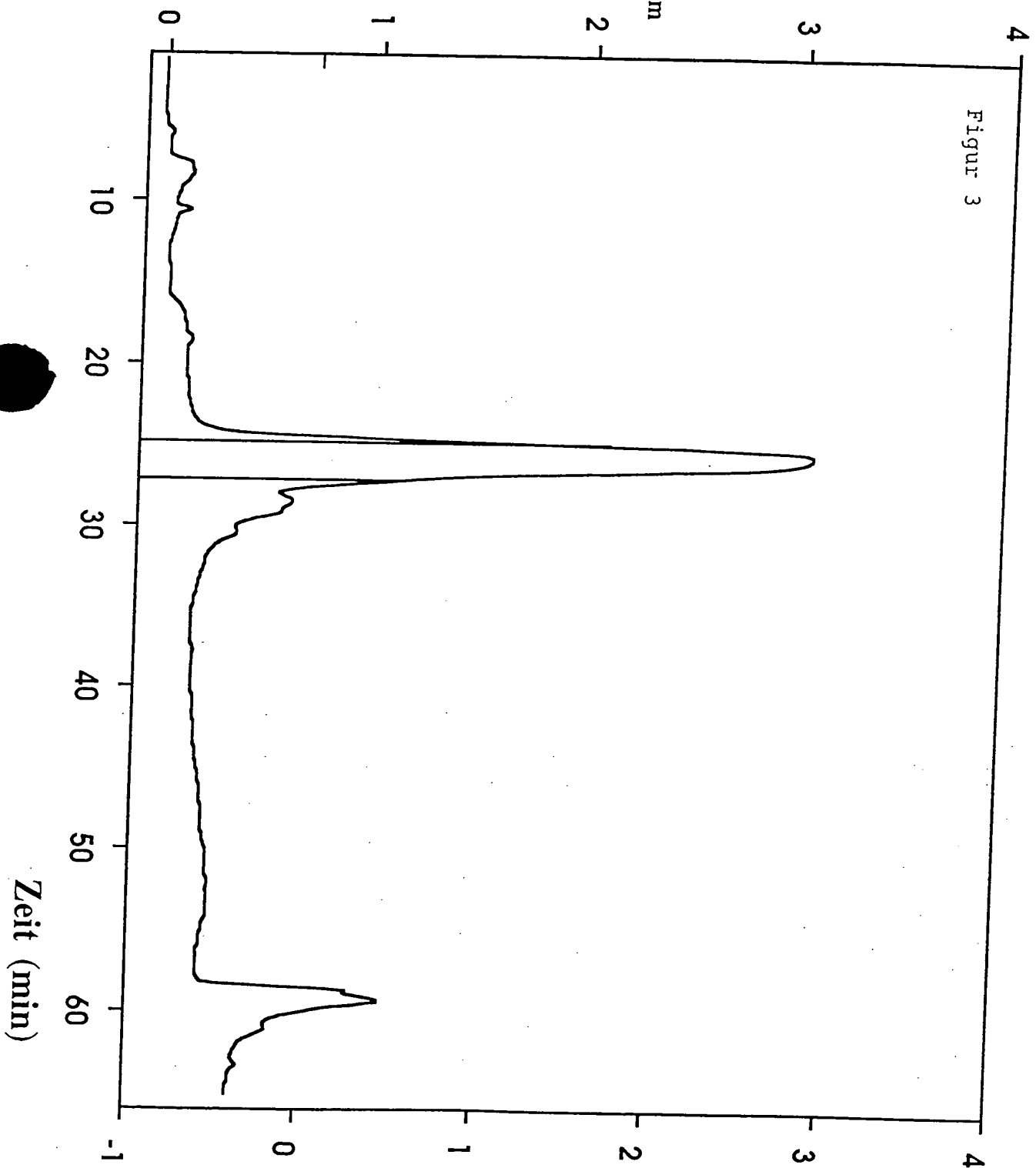
sowie die amidierten, acetylierten, sulfatierten, phosphorylierten, glycosylierten, oxydierten Derivate oder Fragmente mit bifidogenen Eigenschaften und Peptide, die durch Kombination der Peptide, Fragmente oder Derivate mittels chemischer Verknüpfung erhältlich sind.



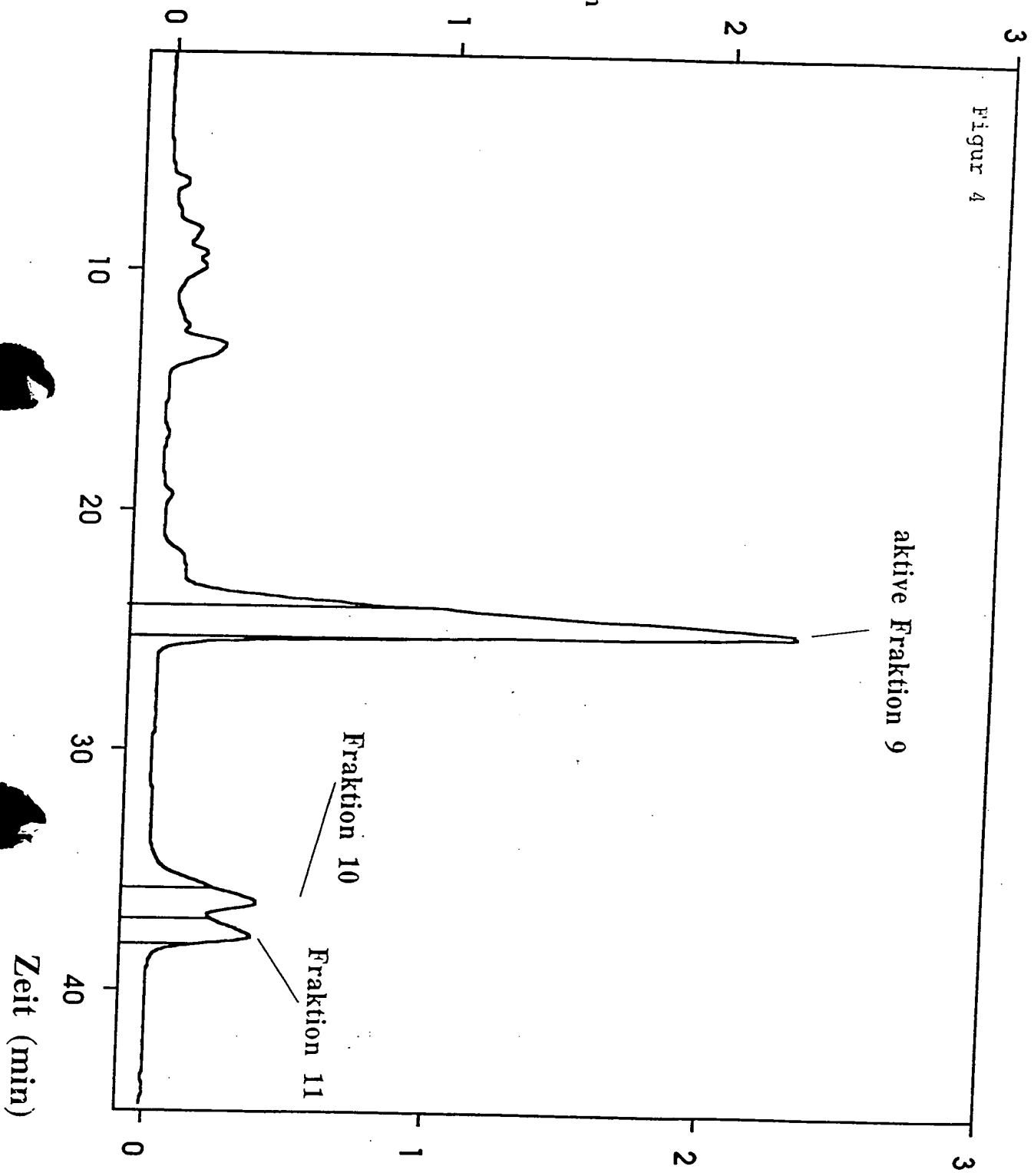
- 2/4 -
 $A_{E\ 280\text{ nm}}$



Figur 3



A
E 214 nm
- 4/4 -



THIS PAGE BLANK (USPTO)